مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع آللی ژن‌های *VRN1* و *Ppd1* در ارقام مختلف گندم نان

محسن نظری[۱]، علی ایزانلو*[۲]، محمدقادر قادری[۳]، زهره علیزاده[٤]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

[۲]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

[۳]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

[٤]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰٤/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٤/۰۸

چکیده

ژنهای مهم کنترل کننده زمان گلدهی شامل ژنهای پاسخ به بهاره‌سازی و فتوپریود نقش قابل توجهی در سازگاری جغرافیایی و عملکرد زراعی بالا و عملکرد بالقوه در غلات دارند. بررسی و درک تنوع آللی ژن-های بهاره‌سازی و فتوپریود در برنامه‌های اصلاحی گندم و گزینش والدین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. لذا، هدف از این آزمایش بررسی تنوع آللی برای مکانهای ژنی *VRN1* و *Ppd1* با استفاده از نشانگرهای مولکولی کارکردی در ۳۸ رقم گندم نان بود. در این تحقیق فراوانی آلل های *vrn*-A1، *Vrn*-A1a و *Vrn*-A1b در مکان ژنی *Vrn*-A1 به ترتیب ۵۷/۹، ۳۹/۵ و ۲/٦ درصد بود. در مکان ژنی *Vrn*-D1، آلل های *vrn*-D1 و *Vrn*-D1 به ترتیب دارای فراوانی ۷۳/۷ و ۲٦/۳درصد بودند. در مکان ژنی *Vrn*-B1، بیشترین فراوانی آللی مربوط به *Vrn*-B1a با ٤٤/۷درصد بود، در حالیکه فراوانی آلل های *Vrn*-B1b، *Vrn*-B1c و *vrn*-B1 در این مکان ژنی به ترتیب ۲۱/۰، ۱۸/٤ و ۱۳/۲ درصد بود. تنوع آللی برای ژن‌های فتوپریود نیز در جمعیت مورد مطالعه یافت شد. بطوریکه در مکان ژنی *Ppd*-D1، فروانی آلل های *Ppd*-D1a و *ppd*-D1b به ترتیب ۷۱/۰ و ۲۹/۰ درصد بود. در مکان ژنی *Ppd*-B1، ۱۸ ژنوتیپ *Ppd-B1a* و ۲۰ ژنوتیپ *ppd-B1b* را نشان دادند. بطور کلی فراوانی آلل *Ppd*-D1a بیشتر از بقیه بوده و به دنبال آن به ترتیب فراوانی آلل *Vrn*-A1a، *Vrn*-D1، *Ppd*-B1b و *Vrn*-B1a بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که فراوانی آلل غالب در مکان‌های ژنی VRN1 و *Ppd*-D بیشتر بوده و بر این اساس، بیشتر ارقام بهاره و غیر حساس به فتوپریود می‌باشند. نتایج این تحقیق می تواند به بهنژادگران در برنامه های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر یاری نماید.

واژگان کلیدی: *فتوپریود، نشانگر مولکولی، ژنوتیپ، بهاره سازی.*

*نویسنده مسئول: علی ایزانلو تلفن: ۰۹۱۵۹۷۷۶۱٤۵ Email: a.izanloo@birjand.ac.ir

مقدمه

گندم یکی از گسترده‌ترین گیاهان زراعی تحت کشت در جهان است که در دامنه وسیعی از عرضهای جغرافیایی (از ٦٠ درجه شمالی تا ٤٨ درجه جنوبی)، شرایط اقلیمی، و حاصلخیزی خاک کشت می‌شود. برای سازگاری با چنین عرصه‌های گوناگون طیف گسترده‌ای از تغییرات ژنتیکی در جایگاههای خاصی ضروری است. در سطح مولکولی سازگاری گندم عمدتاً بوسیله ۳ گروه از فاکتورهای ژنتیکی شامل؛ ژن‌های ورنالیزاسیون[1] یا نیاز به بهاره‌سازی (*VRN*)، ژن-های فتوپریود یا حساس به طول روز (*Ppd*) و ژن‌های کنترل کننده زودرسی ذاتی (*Eps*) کنترل می‌شوند (Zhang *et al*., 2008). از میان این گروه‌های ژنی، ژن‌های بهاره‌سازی (*Vrn*) و فتوپریود (*Ppd*) تنظیم کننده‌های اصلی عادت رشدی گیاه می‌باشند که به ژن‌های عادت گلدهی نیز معروفند (Distelfeld *et al*., 2009). ژن‌های فتوپریودی و بهاره‌سازی به تغییرات محیطی با تاخیر یا تسریع در زمان گلدهی واکنش نشان می‌دهند، بنابراین از در معرض قرارگرفتن آغازه‌های[2] گل در درجه حرارت‌های بالای کشنده جلوگیری می‌نماید. همچنین سازوکار تحمل به سرما در گندم پاییزه ارتباطی بنیادین با نیاز بهاره‌سازی دارد، که این نیز سبب تأخیر درگذار از مرحله رویشی و ورود به مرحله زایشی شده و دستاورد آن پیشگیری از بروز خسارت سرما است (Fowler *et al*., 2001; Limin and Fowler, 2006). به طور کلی، نمو گیاه و انتقال از مرحله رویشی به زایشی در ابتدا توسط نیاز به بهاره سازی که ممکن است به صورت اثر متقابل با یک نظام طول روز همراه باشد، کنترل می‌شود (Wallace and Yan, 1998). سپس توسط نظام عکس العمل به طول روز بعد از بهاره‌سازی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و در نهایت توسط ارتباط با نظام همیشه موثر دما، کنترل می‌شود. بنابراین، یکی از عواملی که با بررسی آن و تعیین وضعیت یک رقم تجاری از لحاظ ژنتیکی در درک و توصیف سازگاری عمومی و خصوصی اهمیت دارد، بدون شک نیاز به بهاره‌سازی و طول روز است. در این بین صفات زودرسی ذاتی و مقاومت به سرما یا یخبندان نیز که ممکن است در ترکیب با دو نظام طول روز و نیاز به بهاره‌سازی، باعث تأثیر گذاری بر نمو و فنولوژی گیاه شوند، نباید نادیده گرفته شوند (Snape, 1998; Snape *et al*., 2001).

گندم بر اساس درجه حرارت و زمان گلدهی به دو عادت رشد زمستانه و بهاره تقسیم بندی می‌شود. گندم زمستانه نیاز به یک دوره سرما جهت گلدهی دارد، که معمولاً در پاییز کشت می‌شود و در سال بعد برداشت می‌شود، درحالی که گندم بهاره بدون گذراندن دوره سرمایی معمولاً در همان سالی که کاشته شد، برداشت می‌شود.

فرایند بهاره‌سازی باعث تسریع زمان گلدهی در غلات می‌شود که بوسیله دمای پایین صورت

[1] Vernalization
[2] Primordia

می‌گیرد. این فرایند زمانی انجام می‌شود که درجه حرارت هوا بین صفر تا ۱۰ درجه سانتی گراد و به مدت چند هفته نوسان داشته باشد (Flood and Halloran, 1984). مطالعات فیزیولوژیکی نشان داد که مراکز واکنش به بهاره‌سازی در نوک ساقه قرار دارد (Amasino, 2004). عادت رشد زمستانه یا بهاره توسط ۳ آلل در جایگاه‌های *Vrn-A1*، *Vrn-B1* و *Vrn-D1* که به ترتیب بر روی کروموزوم 5A، 5B و 5D واقع شده اند کنترل می‌شود (Law *et al*., 1978; Galiba *et al*., 1995; Dubcovsky *et al*., 1998). در مجموع این ۳ ژن به عنوان جایگاه *Vrn1* شناخته می‌شوند، که جایگاه اصلی گلدهی می‌باشد. ژنتیک مولکولی مکانیسم‌های مورد نیاز برای بررسی بهاره‌سازی را در محصولات زراعی از جمله گندم بخوبی درک و مورد بررسی قرار داده است (Cockram *et al*., 2007; Trevaskis *et al*., 2007). حضور آلل مغلوب در تمام این مکان‌ها باعث عادت رشد زمستانه می‌شود، در حالی‌که حضور یک آلل غالب در این جایگاه‌ها باعث رشد بهاره می‌گردد (Stelmakh, 1992).

تفاوت در توزیع ژن‌های *Ppd* در ژرم پلاسم‌های گندم به صورت کلاس‌های مختلف حساس به طول روز بلند و غیر حساس به طول روز تقسیم می‌شود. در گندم عکس‌العمل به طول روز توسط ۳ مکان ژنی که بر روی کروموزوم‌های 2D، 2B و 2A قرار دارند، کنترل می‌شود (Keim *et al*., 1973; Welsh *et al*., 1973). بطوریکه، آلل‌های غالب (*Ppd-D1a*، *Ppd-B1a* و *Ppd-A1a* که قبلاً به ترتیب *Ppd1*، *Ppd2* و *Ppd3* نامیده می‌شدند) در این مکانهای ژنی باعث اعطای عدم حساسیت به فتوپریود و آلل‌های مغلوب آنها (*ppd*-D1b، *ppd*-B1b و *ppd*-A1b) حساسیت به فتوپریود را موجب می‌شوند (Law *et al*., 1978). بطور کلی، آلل *Ppd-D1a* به عنوان قوی‌ترین آلل در نظر گرفته می‌شود که به دنبال آن *Ppd-B1a* و بعد از آن *Ppd-A1a* می‌باشد (Scarth and Law, 1984)، هر چند که مطالعه اخیر Tanio and Kato (2007) نشان داد که *Ppd*-B1a می‌تواند اثر یکسانی همانند *Ppd*-D1a داشته باشد. مطالعات متعدد نشان داد که در تمام محیط‌ها، گندم‌های غیر حساس به فتوپریود تمایل به بلوغ زودتری نسبت به گندم های حساس به فتوپریود دارند (Kato and Yokoyama, 1992; Worland *et al*., 1994; Worland, 1996; Worland and Sayers, 1996; Worland *et al*., 1998; Cane *et al*., 2013).

با توجه به اهمیت و نقش بهاره‌سازی و فتوپریود در سازگاری گندم، بررسی و درک توزیع آللی ژن‌های کنترل کننده آنها و کاربرد اطلاعات بدست آمده از طریق گزینش به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. چندین روش فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در دسترس برای تشخیص ژن‌های بهاره سازی و فتوپریود در گندم و سایر غلات و حبوبات وجود دارد. با این حال، برخی از آنها وقت گیر و نیاز به کار فشرده دارد و تحت تأثیر شرایط محیطی نیز می‌باشد، در نتیجه برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی بسیار دشوار است.

پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک مولکولی موجب شده تا همسانه سازی ژن‌های بهاره سازی (Yan *et al*., 2003) و فتوپریود (Beales *et al*., 2007) در گندم انجام شود، همچنین موجب تسهیل در توسعه‌ی نشانگرهای ژن و آلل اختصاصی (نشانگرهای تشخیصی) شده است. لذا، هدف از این آزمایش تعیین خصوصیت و بررسی تنوع آللی برای ژن‌های بزرگ اثر در ژن‌های بهاره سازی و فتوپریود در گندم های نان می‌باشد، که نقش مهمی در سازگاری و عملکرد بالقوه و عملکرد پتانسیل دانه در مناطق جغرافیایی مختلف دارند. آگاهی از مناسب ترین ترکیب آللی *VRN-1* و *Ppd-1* به بهنژادگران این اجازه را می‌دهد که از ژرم پلاسم‌های متنوع برای به حداکثر رساندن پتانسیل عملکرد دانه و مقاومت به خشکی و سرما در تلاقی‌ها استفاده کنند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق ۳۸ رقم گندم نان رایج کشت در مناطق خشک و نیمه خشک شامل؛ الموت، الوند، آذر۲، بزوستایا، هیرمند، قدس، نیک‌نژاد، شعله، کرج۳، داراب۲، کویر، هامون، روشن، رسول، شاهپسند، پیشتاز، استار، ورییناک، شیراز، اکبری، دز، شوری، ارگ، اوحدی، آنفام٤، استورک، کاسکوژن ریژاو، اترک، کوهدشت، زرین، کراس سبلان، بک کراس روشن، کریم، بم، اکسکلیبر و گلادیوس بودند. بذور ژنوتیپ‌های مورد نظر در گلخانه کشت و گیاهچه‌های ۲-۳ برگی مناسب برای استخراج DNA ژنومی بدست آمد. استخراج DNAی ژنومی طبق روش Pallotta *et al.* (2003) با اندکی تغییر انجام شد. کمیت و کیفیت DNA نیز با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ Termo و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین گردید.

در این تحقیق، از ترکیب ١٦ آغازگر تشخیصی به منظور بررسی وضعیت آللی ژن‌های بهاره-سازی و فتوپریود مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر جایگاه‌های نشانگرهای آلل اختصاصی در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزای ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۰,٤ پیکومول) و ۱۰ میکرولیتر PCR MasterMix (تهیه شده از شرکت سیناکلون)، و تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب دیونیزه دو بار تقطیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای هر ترکیب آغازگر در جدول ۱ آمده است. جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام و رنگ‌آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک عکس برداری از ژل انجام شد. اندازه نوارهای تکثیر شده برای آلل‌های مختلف مورد نظر با استفاده از DNA Ladder، ۱۰۰ bp تعیین شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای آلل اختصاصی برای ژن های بهاره سازی در مکان‌های ژنی VRN-1 و Ppd-1.

Table 1- Sequences of allele specific primers for vernalization and photoperiod genes at the VRN-1 and Ppd-1 loci.

ویژگی Trait	مکان locus	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (3→5) Primer sequence	اندازه باند (bp) Band Size (bp)	آلل Allele	شرایط PCR PCR conditions
بهاره سازی Vernalization	*VRN-A1*	VRN1AF	GAAAGGAAAAATTCTGCTCG	965+876	*Vrn-A1a*	94c° ،3 min; (94c° ،30s; 66c° ،30s; 72c° ،45s); for 35 cycles
		VRN1-INT1R	GCAGGAAATCGAAATCGAAG	714	*Vrn-A1b*	
				734	*vrn-A1 or Vrn-A1c*	
		Intr1/A/F2	AGCCTCCACGGTTTGAAAGTAA	1170		94c° ،3 min; (94c° ،45s; 51c° ،45s; 72c° ،1 min); for 35 cycles
		Intr1/A/R3	AAGTAAGACAACACGAATGTGAGA		*Vrn-A1c*	
	VRN-D1	Intr1/D/F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	997	*vrn-D1*	94c° ،4 min; (94c° ،45s; 61c° ،45s; 72c° ،1 min); for 35 cycles
		Intr1/D/R3	GGTCACTGGTGGTCTGTGC	1671	*Vrn-D1*	
		Intr1/D/R4	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG			
	VRN-B1	Ex1/B/F3	GAAGCGGATCGAGAACAAGA	709 + 1235	*Vrn-B1a*	94c° ،2 min; (94c° ،30s; 52c° ،30s; 72c° ،90s); for 35 cycles
		Intr1/B/F	CAAGTGGAACGGTTAGGACA	673 +1199	*Vrn-B1b*	
		Intr1/B/R3	CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	849	*Vrn-B1c*	
		Intr1/B/R4	CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	1149	*vrn-B1*	
فتوپریود photoperiod	*Ppd-D1*	Ppd-D1_F: Ppd-D1_R1	ACGCCTCCCACTACACTG GTTGGTTCAAACAGAGAGC	414	*ppd-D1b*	94c° ،3 min; (94c° ،45s; 54c° ،40s; 72c° ،60s); for 35 cycles
		Ppd-D1_R2:	CACTGGTGGTAGCTGAGATT	288	*Ppd-D1a*	
	Ppd-B1	TaPpd-B1proF1	ACACTAGGGCTGGTCGAAGA	1600	*Ppd-B1a*	95c° ،3 min; (95c° ،30s; 64c° ،60s; 72c° ،90s); for 35 cycles
		TaPpd-B1int1R1	CCGAGCCAGTGCAAATTAAC	1292	*ppd-B1b*	

نتایج و بحث

در این مطالعه به منظور بررسی تنوع آللی از جفت پرایمر اختصاصی VRN1AF و VRN1-INT1R توصیف شده توسط Yan *et al.* (2004) به منظور شناسایی آلل غالب بهاره *Vrn*-A1 در تمام ارقام گندم نان استفاده شد. ۱۵ ژنوتیپ آلل غالب *Vrn*-A1a را تکثیر کردند (باند ۹۶۵ bp–۸۷۶). تنها ژنوتیپ هیرمند آلل *Vrn*-A1b را با اندازه باند ۷۱٤ bp تکثیر کرد. ۲۲ ژنوتیپ باقی مانده، باند ۷۳٤ bp را تکثیر کردند که نشان داد این ارقام یا حامل آلل غالب *Vrn*-A1c هستند، یا آلل مغلوب *vrn*-A1 را دارند (Zhang *et al.*, 2008). به منظور تفکیک بین این دو آلل از یک جفت پرایمر Intr1/A/F2 و Intr1/A/R3 استفاده شد. بعد از تکثیر محصولات مشخص شد همه ۲۲ رقمی که باند ۷۳٤ bp را تکثیر کردند، آلل مغلوب *vrn*-A1 را داشتند (شکل ۱ الف). بطور کلی، نتایج نشان داد که ۵۷/۹۰ درصد از ارقام (۲۲ رقم) مورد مطالعه آلل مغلوب *vrn*-A1 را نشان دادند و ۳۹/٤۷ درصد آلل غالب *Vrn*-A1a و تنها ۲/٦۳ درصد نیز آلل *Vrn*-A1b را تکثیر کردند. در این مطالعه، آلل *Vrn*-A1c مشاهده نشد.

برای مکان ژنی *Vrn*-B1، از ترکیب پرایمری Ex1/B/F3 و Intr1/B/R3 و Intr1/B/F و Intr1/B/R4 بصورت مولتی پلکس استفاده شد (Milec *et al.*, 2012). ۱۷ ژنوتیپ (٤٤/۷ درصد) شامل آلل *Vrn*-B1a بودند، زیرا باند ۷۰۹bp را تکثیرکردند (شکل ۱ب). عدم وجود محصول حاصل از PCR در ژنوتیپ‌های گندم باقی مانده نشان می‌دهد که آنها حامل آلل مغلوب هستند. برای تایید آن از ترکیب پرایمری Intr1/B/F و Intr1/B/R4 استفاده شد. باند bp ۱۱٤۹ در ۵ ژنوتیپ گندم نان حضور آلل مغلوب *vrn*-B1 را نشان دادند. در مجموع، در مکان ژنی *Vrn*-B1، ٤٤/۷۳ درصد از ارقام آلل *Vrn*-B1a را با ترکیب باندی ۷۰۹ و ۱۲۳۵ جفت بازی را نشان دادند، همچنین ۱۳/۱۵ درصد از ارقام آلل مغلوب *vrn*-B1 را با اندازه باند bp ۱۱٤۹ تکثیر کردند و ۲۱/۱ درصد از ارقام دارای آلل *Vrn-B1b* با ترکیب باندی bp ٦۷۳ و bp ۱۱۹۹ را نشان دادند. ۱۸/٤۲ درصد از ارقام آلل *Vrn*-B1c را با اندازه باند bp ۸٤۹ تکثیر کردند.

در جایگاه ژنی *Vrn-D1*، با استفاده از یک جفت پرایمر Intr1/D/F و Intr1/D/R3، ۱۰ ژنوتیپ باند bp ۱٦۷۱ را تکثیر کردند که آلل غالب *Vrn*-D1 را نشان می‌دهد، همچنین باند bp ۹۹۷ در ۲۸ ژنوتیپ مشاهده شد، از ترکیب پرایمری Intr1/D/F و Intr1/D/R4 استفاده شد که نشان دهنده آلل مغلوب *vrn*-D1 بود (شکل ۱ ج). ۷۳/٦۸ درصد از ارقام آلل مغلوب *vrn*-D1 را با اندازه باند bp ۹۹۷ تکثیر کردند در حالیکه آلل غالب*Vrn*-D1 تنها در ۲٦/۳۲ درصد از ارقام مشاهده شد.

در جایگاه ژنی *Ppd*-D1، از ۳۸ رقم مورد مطالعه ۲۷ رقم قطعه bp ٤۱٤ را در PCR تکثیر کردند که نشان دهنده آلل *Ppd*-D1a می‌باشد، که غیر حساس به فتوپریود می‌باشد و تنها ۱۱ رقم

آلل *ppd*-D1b را تکثیر کردند که حساس به فتوپریود می‌باشد. به طور کلی فراوانی آلل غالب *Ppd*-D1a در ارقام مورد مطالعه زیاد می‌باشد. که نشان می‌دهد ارقام ایرانی غیر حساس به فتوپریود می‌باشند. بنابراین باید اصلاح گران در اصلاح ژرم پلاسم‌ها این موضوع را مد نظر قرار دهند. در این جایگاه ژنی، ۷۱/۰۵ درصد از ارقام آلل غالب *Ppd-D1a* را با اندازه باند ۲۸۸ bp تکثیر کردند و تقریباً در ۲۸/۹۵ درصد از ارقام آلل مغلوب *ppd*-D1b با اندازه باند ٤١٤ bp مشاهده شد (شکل ۲ ب). آلل *Ppd-D1a* در ٦٠ درصد از ارقام ترکیه یافت شد (Andeden *et al*., 2011). در تحقیقی Zhang *et al*. (2010) فراوانی این آلل را در ۹۲۹ رقم اصلاح شده و نژاد محلی گندم چین ٦٦ درصد گزارش کردند. اکثر واریته های گندم اصلاح شده مورد کشت در جنوب و مرکز اروپا به خاطر سازگاری گسترده تر آنها غیر حساس به فتوپریود هستند (Foulkes *et al*., 2004).

اما در مکان ژنی *Ppd*-B1، با استفاده از یک جفت آغازگر TaPpd-B1proF1 و TaPpd-B1int1R1 در PCR، از بین ۳۸ رقم ۲۰ ژنوتیپ باند ۱۲۹۲ bp را تکثیر کردند که آلل مغلوب و حساس به فتوپریود *ppd*-B1b را نشان می‌داد و ۱۸ رقم مابقی باند ١٦٠٠ bp را تکثیر کردند که آلل غالب *Ppd*-B1a بودند که غیر حساس به فتوپریود می‌باشد (شکل ۲ الف). در مجموع، در این مکان ژنی ٤٧/٣٦ درصد از ارقام حاوی آلل مغلوب حساس به فتوپریود *ppd*-B1b بودند که باند ۱۲۹۲ bp را تکثیر کردند. ۵۲/٦٣ درصد از ارقام آلل مغلوب غیر حساس به فتوپریود *Ppd*-B1a (باند ١٦٠٠ جفت بازی) را نشان دادند.

فراوانی آلل *Vrn*-A1a در مجموعه گندم‌های مورد بررسی در مقایسه با مجموعه گندم‌های مختلف جهان پایین‌تر بودند. Iqbal *et al*. (2007) فراوانی آلل *Vrn*-A1a را در ژنوتیپ‌های گندم بهاره در کانادا ۸۵ درصد گزارش کردند، درحالیکه آلل *Vrn*-A1b را تنها در یک رقم مشاهده کردند. آنها همچنین هیچ آلل *Vrn*-A1c را در مجموعه‌ی خود مشاهده نکردند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در گندم های ترکیه نیز آلل *Vrn*-A1c گزارش نشد (Andeden *et al*., 2011). فراوانی آلل *Vrn*-A1a در ژرم پلاسم گندم نواحی شمال غربی ایالات متحده آمریکا ٦٩ درصد (Santra *et al*., 2009)، ۵۰ درصد در ارقام گندم بهاره آمریکا و آرژانتین (Yan *et al*., 2004) و ٤٤ درصد در گندم های چینی (Zhang *et al*., 2008) گزارش شد.

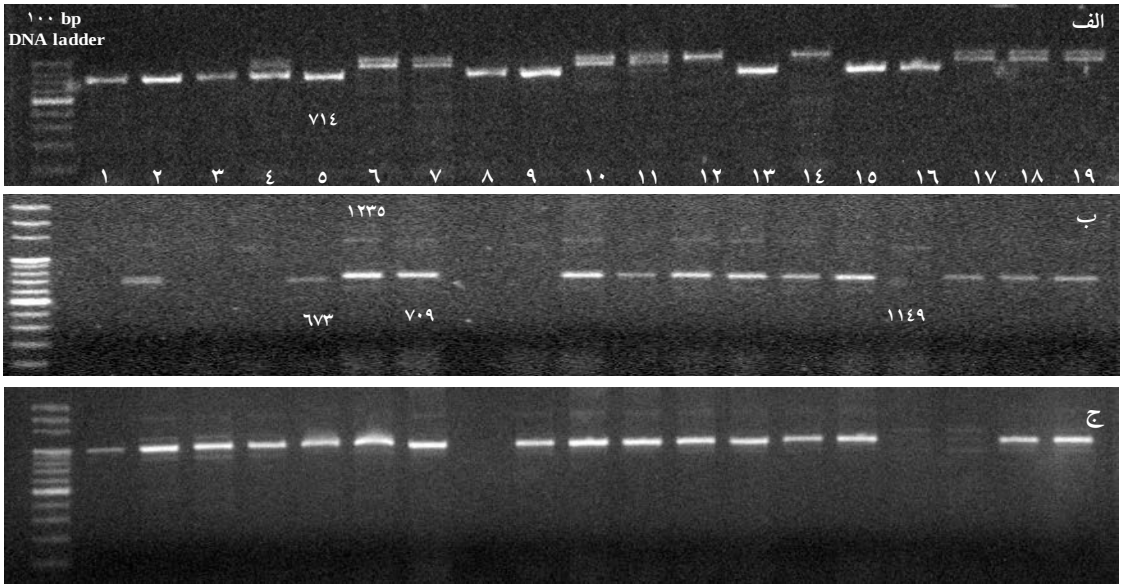
نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات مختلف آلل های *Vrn* عادت رشدی بهاره را در گندم های مورد مطالعه کنترل می‌کنند. آلل *Vrn*-A1a تقریباً در ۳۹/۵ درصد ژنوتیپ های مورد مطالعه مشاهده شد. گندم های بهاره ای که دارای آلل *Vrn*-A1a باشند نیازی به بهاره‌سازی ندارند (Shindo and Sasakuma, 2002)، بنابراین نسبت به ژنوتیپ های دارای آلل های *Vrn*-B1 یا *Vrn*-D1 در شرایط بهاره‌سازی نشده زودتر گل می دهند.

آلل *Vrn*-B1a بیشترین فراوانی (٤٤ درصد) را در گندم های مورد مطالعه داشت. در واریته های گندم ترکیه بیشترین فراوانی آللی مربوط به *Vrn-B1* گزارش شد (Andeden *et al.*, 2011)، Iqbal *et al.* (۲۰۰۷) فراوانی این آلل را در لاینهای مورد مطالعه ۵۰ درصد گزارش نمودند. درحالیکه، فراوانی آلل غالب *Vrn-B1* در گندم های چینی کمتر (۲٦ درصد) گزراش شد (Zhang *et al.*, 2008).

vrn-D1 دارای بیشترین فراوانی (۷۳/۷ درصد) در بین ارقام مورد مطالعه بود، و آلل غالب *Vrn-D1* کمترین فراوانی را داشت. آلل *Vrn*-D1 در ۲۷ درصد از واریته های گندم ترکیه مشاهده شد (Andeden *et al.*, 2011). این آلل همچنین به عنوان باوفورترین آلل در ارقام گندم استرالیایی گزارش شد، که دلیل آن استفاده از مواد اصلاحی سیمیت در توسعه ارقام استرالیایی بوده است (Eagles *et al.*, 2009).

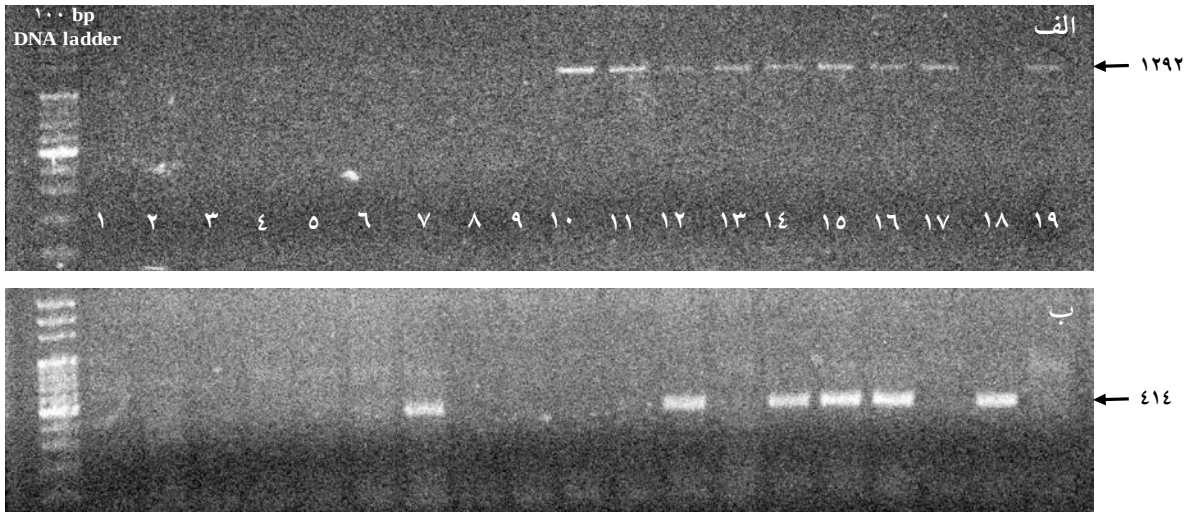
بهاره سازی و فتوپریود نقش مهمی در سازگاری جغرافیایی، عملکرد زراعی، کیفیت و عملکرد بالقوه محصولات در گندم را دارا می-باشد. ژن‌های بهاره سازی و فتوپریود نقش مهمی در تغییرات زمان گلدهی و بلوغ برای فرار از خشکسالی و یا تنش حرارتی طی پر شدن دانه و یا آسیب از یخ زدگی در برخی از مناطق را دارند. بطوریکه، متوسط عملکرد دانه در هربوته در محیط‌های مختلف برای ژنوتیپ‌های گندم بهاره با آلل‌های *Vrn*-A1 یا *Vrn*-B1 بالاترین مقدار، در حالی که ارقام با هر ۳ آلل غالب همولوگوس در ژن *Vrn-1* کمترین عملکرد دانه را دارا بودند (Stelmakh, 1992). در مطالعه ای Santra *et al.* (2009) نتیجه گیری کردند که اگر درجه حرارت و تنش خشکی در طول پر شدن دانه اتفاق بیفتد، بالاترین عملکرد دانه برای گندم‌های غیرحساس به فتوپریود با آلل غالب *Vrn*-D1 در ترکیب با آلل *Vrn*-A1 یا *Vrn*-B1 اتفاق می‌افتد. بنابراین، بهینه سازی ترکیب آللی در جایگاه *Vrn-1* با عدم حساسیت به فتوپریود می‌تواند فرصت را برای توسعه ارقام گندم با عملکرد بالقوه بالا و انطباق با طیف وسیع تری از شرایط آب و هوایی متفاوت را ممکن سازد.

اطلاعات درباره ژنوتیپ *Vrn* در پاسخ به مقاومت به سرما و دمای پایین در غلات مهم می-باشد. وجود آلل هموزیگوت مغلوب در هر ۳ جایگاه ژنی *VRN-1* باعث عادت رشد زمستانه در گندم هگزاپلوئید می‌شود با این حال در برخی از موارد وجود آلل غالب *Vrn*-B1 یا *Vrn*-D1 برای تعیین عادت رشد بهاره کافی است. *Vrn*-A1 آلل اصلی در تعیین عادت رشدی گندم محسوب می‌شود با توجه به جدول شماره ۲ ارقام الموت، الوند، آذر۲، آنفارم٤، بم، پیشتاز، شاهپسند، شوری، بزوستایا، هیرمند و رسول با وجود غالب بودن در مکان ژنی *Vrn*-D1 ولی دارای عادت رشدی زمستانه می‌باشد.



شکل ۱- تکثیر قطعات حاصل از PCR برای نشانگرهای اختصاصی برای؛ الف) مکان ژنی *Vrn*-A1، ب) مکان ژنی *Vrn*-B1، و ج) مکان ژنی *Vrn*-D1. شماره لین ها از ۱ تا ۱۹ به ترتیب ارقام الموت، الوند، آذر۲، بزوستایا، هیرمند، قدس، نیکنژاد، شعله، کرج۳، داراب۲، کویر، هامون، روشن، رسول، شاهپسند، پیشتاز، استار، ورینک و شیراز می باشند.

Figure 1- PCR amplification of specific markers for a) *Vrn-A1* locus, B) *Vrn-B1*locus, and c) *Vrn*-D1 locus. Lane numbers from 1 to 19 are Alamoot, Alvand, Azar2, Bezostaja, Hirmand, Qouds, Niknejad, Shole, Karaj3, Darab2, Kavir, Hamoon, Rooshan, Rasool, Shahpasand, Pishtaz, Star, Verinak and Shiraz, respectively.



شکل ۲-تکثیر قطعات PCR برای آغازگرهای اختصاصی در مکان ژنی، الف) *Ppd-B1* و ب) *Ppd-D1*. شماره لین ها از ۱ تا ۱۹ به ترتیب ارقام الموت، الوند، آذر۲، بزوستایا، هیرمند، قدس، نیکنژاد، شعله، کرج۳، داراب۲، کویر، هامون، روشن، رسول، شاهپسند، پیشتاز، استار، ورینک و شیراز می باشند.

Figure 2 - PCR amplification of allele specific primers for; a) Ppd-B1 locus and b) Ppd-D1 locus. Lane numbers from 1 to 19 are Alamoot, Alvand, Azar2, Bezostaja, Hirmand, Qouds, Niknejad, Shole, Karaj3, Darab2, Kavir, Hamoon, Rooshan, Rasool, Shahpasand, Pishtaz, Star, Verinak and Shiraz, respectively.

به طور کلی ارقام به دو گروه غیرحساس و حساس به فتوپریود طبقه بندی شدند. ۲۷ رقم آلل غالب عدم حساسیت به فتوپریود را نشان دادند که شامل ارقام داراب۲، کویر، روشن، استار، شیراز، الموت، الوند، آذر۲، بزوستایا، هیرمند، قدس، شعله، کاسکوژن، ریژاو، رصد، اترک، کوهدشت، زرین، دز، اوحدی، استورک، کراس سبلان، بک کراس روشن، کریم، اکسکلیبر، گلادیوس وکرج ۳ بودند. این ارقام به عنوان ارقام غیرحساس به فتوپریود شناسایی شدند. ۱۱ رقم شامل؛ هامون، رسول، شاهپسند، پیشتاز، نیک‌نژاد؛ اکبری، شوری، ارگ، آنفرم٤، بم و ورینک آلل مغلوب حساسیت به فتوپریود *ppd-D1b* و *Ppd-B1a* را داشتند، که از میان آنها ۵ رقم ورینک، نیک نژاد، اکبری، شوری و ارگ در هر دو مکان ژنی دارای آلل های مغلوب حساسیت به فتوپریود (*ppd-D1b* و *ppd-B1b*) را نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که اکثر ارقام مورد مطالعه غیرحساس به فتوپریود بوده و اصلاح ارقام در بیشتر برنامه های اصلاحی برای گزینش ارقام غیرحساس به طول روز بوده است. بطور کلی، با دانستن ترکیب آللی مناسب به اصلاح گران این امکان را می‌دهد که هنگام معرفی یک رقم جدید صرفا به روش‌های بیومتریک اکتفا نکنند و برای تعیین سازگاری عمومی و خصوصی ارقام با استفاده از روش‌های مولکولی ژنوتیپ های موثر را شناسایی کنند.

نتایج این تحقیق مبنایی را برای درک اساس ژنتیکی زمان گلدهی در گندم های ایرانی فراهم می‌کند. البته مطالعات بعدی جهت بررسی نقش سامانه های ژنتیکی دیگر کنترل کننده زمان گلدهی در گندم و سازگاری آنها در گندم های ایرانی ضروری است. با توجه به شرایط اقلیمی کشور و وجود نواحی اقلیمی گوناگون، درک اساس ژنتیکی زمان گلدهی و رسیدگی، توسعه ارقام جدید گندم با تنظیم دقیق زمان گلدهی که بتواند از تنشهای زیستی و غیر زیستی فرار کند را تسهیل می نماید. بنابراین، گزینش برای عادت رشدی هدف خیلی مهمی در برنامه های اصلاحی شده است. نشانگرهای مولکولی کارکردی مرتبط با ژن‌های *Vrn-1* و *Ppd-1* می توانند جهت تسریع در توسعه ارقام گندم سازگار با پتانسیل عملکرد خوب برای محیط های هدف مورد استفاده قرار گیرند.

جدول ۲- ترکیب آللی ژن‌های بهاره سازی و فتوپریود در مکان‌های ژنی *VRN*-1 و *Ppd*-1.

Table 2- The allelic combinations of vernalization and photoperiod genes at the VRN-1 and Ppd-1 loci.

ترکیب آللی Allelic composition		ژنوتیپ
VRN-1	Ppd-1	Genotype
vrn-A1, vrn-B1, Vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	الموت-الوند-آذر۲ Allamot-Alvand-Azare2
vrn-A1, Vrn-B1a, Vrn-D1	*ppd-D1b, Ppd-B1a*	آنفارم٤-بم-پیشتاز-شاهپسند-شوری Akfarm4-Pishtaz-Shahpasand-Shori
Vrn-A1a, Vrn-B1a, Vrn-D1	*Ppd-D1a, Ppd-B1a*	داراب۲-کوهدشت-کویر Darabe2-Kohdasht-Kavir
Vrn-A1a, Vrn-B1a, Vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	شعله-قدس-کرج۳ Shole-Qods-Karaje3
Vrn-A1a, Vrn-B1a, vrn-D1,	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	اوحدی-بک کراس‌روشن-کراس سبلان-کریم Ohadi-Backcross Roshan-Cross Sabalan-Karim
Vrn-A1a, Vrn-B1b, vrn-D1	*Ppd-D1a, Ppd-B1a*	ریژاو-کاسکوژن Rizhav-Kaskogen
Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1	*Ppd-D1a, Ppd-B1a*	اترک-استار Atrak-Star
Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	استورک-دز Stork-Dez
Vrn-A1a, vrn-B1, Vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	بزوستایا Bezostaya
Vrn-A1a, vrn-B1, Vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	هیرمند Hirmand
Vrn-A1a, Vrn-B1b, Vrn-D1a	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	روشن Roshan
Vrn-A1a, Vrn-B1c, vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	زرین Zarin
Vrn-A1a, Vrn-B1a, vrn-D1	*ppd-D1b, ppd-B1b*	ارگ Arg
Vrn-A1a, Vrn-B1a, Vrn-D1	*ppd-D1b, ppd-B1b*	نیک نژاد Niknejad
Vrn-A1a, Vrn-B1b, vrn-D1	*Ppd-D1a, Ppd-B1a*	رصد Rasad
Vrn-A1a, Vrn-B1b, Vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	اکسکلیبر Excalibur
Vrn-A1a, Vrn-B1b, vrn-D1	*Ppd-D1a, ppd-B1b*	گلادیوس Gladious
Vrn-A1a, Vrn-B1b, Vrn-D1	*ppd-D1b, ppd-B1b*	اکبری Akbari
Vrn-A1a, Vrn-B1c, Vrn-D1	*Ppd-D1a, Ppd-B1a*	شیراز Shiraz
Vrn-A1b, Vrn-B1b, Vrn-D1	*ppd-D1b, Ppd-B1a*	ورینک Verinak
Vrn-A1b, Vrn-B1b, Vrn-D1	*ppd-D1b, Ppd-B1a*	هامون Hamon
vrn-A1, نامشخص ,نامشخص	*ppd-D1b, Ppd-B1a*	رسول Rasol

منابع

Amasino R (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of Winter. Plant Cell 16: 2553-2559

Andeden EE, Yediay FE, Baloch FS, Shaaf S, Kilian4 B, Nachit M, Özkan H (2011). Distribution of Vernalization and Photoperiod Genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish Bread Wheat Cultivars and Landraces. Cereal Research Communications 39: 352-364

Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape J, Laurie D (2007). A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics115: 721-733

Cane K, Eagles HA, Laurie DA, Trevaskis B, Vallance N, Eastwood RF, Gororo NN, Kuchel H, Martin PJ (2013) *Ppd-B1* and *Ppd-D1* and their effects in southern Australian wheat. Crop and Pasture Science 64: 100-114

Cockram J, Jones H, Leigh FJ, O'Sullivan D, Powell W, Laurie DA, Greenland AJ (2007). Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. Journal of Experimental Botany 58: 1231-1244

Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. Current Opinion in Plant Biology 12: 1-7

Dubcovsky J, Lijavetzky D, Appendino L, GT (1998). Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. Theoretical and Applied Genetics 97: 968-975

Eagles HA, Cane K, Vallance N (2009). The flow of alleles of important photoperiod and vernalisation genes through Australian wheat. Crop and Pasture Science 60: 646-657

Flood RG, Halloran GM (1984). The nature and duration of gene action for vernalization response in wheat. Annals of Botany 53: 363-368

Foulkes MJ, Sylvester-Bradley R, Worland AJ, Snape JW (2004). Effects of a photoperiod-response gene *Ppd-D1* on yield potential and drought resistance in UK winter wheat. Euphytica 135: 63-73

Fowler DB, Breton G, Limin AE, Mahfoozi S, Sarhan F (2001). Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. Plant Physiology 127: 1676-1681

Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morgounov A, Snape JW (1995). RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost-resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. Theoretical and Applied Genetics 90: 1174-1179

Iqbal M, Navabi A, Yang R-C, Salmon DF, Spaner D (2007). Molecular characterization of vernalization response genes in Canadian spring wheat. Genome 50: 511-516

Kato K, Yokoyama H (1992). Geographical variation in heading characters among wheat landraces, *Triticum aestivum* L, and its implication for their adaptability. Theoretical and Applied Genetics 84: 259-265

Keim DL, Welsh JR, McConnet RL (1973). Inheritance of photoperiodic heading response in winter and spring cultivars of bread wheat. Canadian Journal of Plnat Science53: 247-250

Law CN, Sutka J, Worland AJ (1978). A genetic study of daylength response in wheat. Heredity 41: 575–585

Limin AE, Fowler DB (2006). Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): response to photoperiod, vernalization, and plant development. Planta 224: 360-366

Milec Z, Tomkova´ L, Sumıkova´ T, Pankova K (2012). A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Breeding 30: 317-323

Pallotta MA, Warner P, Fox RL, Kuchel H, Jefferies SJ, Langridge P (2003). Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. *In* Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium Paestum, Italy, pp 789-791

Santra DK, Santra M, Allan RE, Campbell KG, Kidwell KK (2009). Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Pacific Northwest region of USA. Plant Breeding 128: 576-584

Scarth R, Law CN (1984). The control of day-length response in wheat by the group 2 chromosomes. Z Pflanzenzuchtung 92: 140-150

Shindo C, Sasakuma T (2002). Genes responding to vernalization in hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 104: 1003-1010

Snape JW (1998). Golden calves or white elephants? Biotechnologies for wheat improvement. Euphytica 100: 207-217

Snape JW, Butterworth K, Whitechurch E, Worland AJ (2001). Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. Euphytica 119: 185

Stelmakh AF (1992). Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat. Euphytica 65: 53-60

Tanio M, Kato K (2007). Development of near-isogenic lines for photoperiod-insensitive genes, *Ppd-B*1 and *Ppd-D1*, carried by the Japanese wheat cultivars and their effect on apical development. Breeding Science 57: 65-72

Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES, Peacock WJ (2007). The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. Trends in Plant Science 12: 352-357

Wallace DH, Yan W (1998) Plant breeding and whole-system crop physiology, improving crop maturity, adaptation and yield. CAB International, New York, USA.

Welsh JR, Keim DL, Pirasteh B, Richards RD (1973). Genetic control of photoperiod response in wheat. *In* Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium. University of Missouri, Columbia, USA, pp 879–884

Worland AJ (1996). The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. Euphytica 89: 49-57

Worland AJ, Appendino ML, Sayers EJ (1994). The distribution, in European winter wheats, of genes that influence ecoclimatic adaptability while determining photoperiodic insensitivity and plant height. Euphytica 80: 219-228

Worland AJ, Börner A, Korzun V, Li WM, Petrovíc S, Sayers EJ (1998). The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats. Euphytica 100: 385-394

Worland AJ, Sayers E (1996). The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats. Euphytica 89: 49-57

Yan L, Helguera M, Kato K, Fukuyama S, Sherman J, Dubcovsky J (2004). Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 109: 1677-1686

Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. PNAS 100: 6263-6268

Zhang XK, Xiao YG, Zhang Y, Xia XC, Dubcovsky J, He ZH (2008). Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. Crop Science 48: 458-470.

Evaluation of allelic diversity of *VRN1* and *Ppd1* genes in different bread wheat cultivars

Nazari M.[1], Izanloo A.[*2], Ghaderi M.Gh.[3], Alizade Z.[4]

[1]MSc student in plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.
[2]Assistance professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.
[3]Assistance professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.
[4]Assistance professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran.

Abstract

Major flowering time genes including vernalization and photoperiod response play a crucial role in the geographical and agronomical adaptations, and potential yield in cereals. Assessment and understanding of the distribution of allelic variations for vernalization and photoperiod genes is of special importance in wheat breeding programs and parental selection. Therefore, the objective of this study was to evaluate 38 bread wheat varieties for allelic variations at the *VRN1* and *Ppd1* loci, using functional molecular markers. In this study, the frequency of *vrn*-A1, *Vrn*-A1a and Vrn-A1b alleles at the *Vrn*-A1 locus were 57.9, 39.5 and 2.6 percent, respectively. At the *Vrn*-D1locus, *vrn*-D1 and *Vrn*-D1alleles had the frequency of 73.7 and 26.3 percent, respectively. At the Vrn-B1locus, the most frequent allele was *Vrn*-B1a with 44.7 percent, while the frequencies of *Vrn*-B1b, Vrn-B1c and *vrn*-B1 alleles were 21, 18.4 and 13.2 percent, respectively. Allelic variations at the *Ppd*-1 gene were also detected in the studied population. As allelic frequencies of *Ppd*-D1a and *ppd*-D1b at the *Ppd*-D1 locus were 71 and 29 percent, respectively. At the *Ppd*-B1 locus, 18 genotypes had *Ppd*-B1a allele, while 20 others showed *ppd*-B1b allele. In general, *Ppd*-D1 was the most frequent allele, followed by *Vrn*-A1a, *Vrn*-D1, *Ppd*-B1b and *Vrn*-B1a. These results indicate that the frequency of dominant allele at the VRN1 and Ppd1 genes was the highest. Therefore, according to these results, most genotypes can be considered as spring and insensitive to photoperiod.

Keywords: Photoperiod, Molecular markers, Genotype, Vernalization.

[*] Corresponding Author: Izanloo A. Tel: 05612254041 Email: a.izanloo@birjand.ac.ir